动 物 学 研 究 2005, Apr. 26 (2): 209-213 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

改进的培养体系在小鼠体细胞核移植及重构胚ES细胞分离培养中的应用

曹鸿国, 刘俊平, 张 涌*
(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 取8周后的雌性昆明小鼠进行超排，取卵母细胞用作核受体，收集卵母细胞周围的卵丘细胞作核供体，进行体细胞核移植。核移植重构胚经 $SrCl_2$ 激活处理6 h后，与改良的M16培养液和小鼠输卵管上皮细胞共培养；将发育到早期囊胚阶段的重构胚转移至小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上，添加含心肌细胞培养液的ES细胞培养液；把孵出的ICM进行消化接种培养，对孵出的ES细胞集落进行鉴定培养。结果显示，以小鼠卵丘细胞为核供体，体细胞核移植重构胚激活率为65.23%，囊胚发育率为11.69%；9个核移植重构囊胚中分离出ES细胞集落，分离率为2.77%；分离出的核移植ES细胞集落具有岛屿状团状隆起结构、碱性磷酸酶染色呈阳性，体外分化可形成类胚体，并能分化成上皮样或梭形细胞。ES细胞集落经常规冻存和复苏后，显示出同冻存前相似的集落形态，并具有较强的增殖能力。实验证实小鼠输卵管上皮细胞、改良的M16培养液及含心肌细胞培养液的ES细胞培养液可以更为成功地运用于小鼠的体细胞核移植及ES细胞的分离培养研究。

关键词: 心肌细胞; 输卵管上皮细胞; 改良培养液; 小鼠; 体细胞核移植; ES细胞
中图分类号: S865.13; Q813.7 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853 (2005) 02-0209-05

Application of Cultural System Improved in Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer and Isolation of ES Cells from Reconstructed Embryos

CAO Hong-guo, LIU Jun-ping, ZHANG Yong*
(Institute of Bio-engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, *China)*

Abstract: Female mice after 8 weeks were superovulated with PMSG and hCG, and their eggs were taken as recipients. Meanwhile cumulus cells around oocytes were also collected and used as donor cells in somatic cell nuclear transfer. Oocytes injected with donor cell nuclei were activated for 6 h by treatment in M16 media modified containing $SrCl_2$, and then cocultured with mouse oviduct epithelial cell in mM16 medium. When being in the stage of blastocyst, they were transfered on the feeder layers of mouse embryonic fibroblasts, adding ES cell media conditioned. After hatched from blastocysts, ICM were isolated and trypsinized, and then cocultured continuously to gain ES cell masses. Results indicated that activation rate of embryos reconstructed was 65.23%, development rate of blastocyst was 11.69%; ES cell colonies were isolated from 9 blastocysts reconstructed, isolation rate was 2.77%. ES cell colonies isolated were with island-like images and strong positive by AKP staining, could become embryo bodies and spontaneously differentiate into epidermal-like cells around them *in vitro*. In addition, after frozen and thawed routinely, ES cell colonies were with strong proliferation and previous image. It indicates that mouse oviduct epithelial cell, modified M16 media and ES cell media with cardiomyocyte media can be more successfully applied in mouse somatic cell nuclear transfer and isolation of ES cell from reconstructed embryos.

Key words: Cardiomyocyte; Oviduct epithelial cell; Media modified; Mouse; Somatic cell nuclear transfer; ES cell

小鼠卵丘细胞具有取材方便，能较好地支持核移植重构胚发育等优点 (Kato et al, 1999)。近年

收稿日期: 2004-08-16; 接受日期: 2005-02-03
* 通讯作者 (Corresponding author)

已有用小鼠卵丘细胞作核供体进行核移植，从10个重构囊胚中分离并建立了1个胚胎干细胞（embryonic stem cell，ES）系（Muncie et al，2000）。也有用小鼠外周淋巴结中T、B淋巴细胞进行体细胞核移植，从1 000个重构胚中得到41个囊胚，并建立了2个ES细胞系（Hochedlinger & Jaenisch，2002)。上述分离培养过程都是通过在培养液中添加白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor，LIF）来获得具有全能性的ES细胞。但是，其成功率较低。影响小鼠ES细胞分离培养的因素很多，如培养液、胎牛血清、饲养层、分离方法、胚胎质量和消化液等。体外培养的心肌细胞可以分泌LIF、IL（interleukin）-6、IL-11等多种细胞因子，这些因子在ES细胞分离培养过程中共同作用，因而大鼠心肌条件液比单一LIF条件液更能成功地分离培养出ES细胞（Ancey et al，2002)。鉴于此，本文尝试在ES细胞培养液中添加大鼠心肌细胞培养液，用于昆明小鼠核移植重构胚中ES细胞的分离培养研究，现将其结果报道如下。

1 材料与方法

本实验所用SD大鼠（以下简称大鼠）和昆明小鼠（以下简称小鼠）均购自第四军医大学实验动物中心。

1.1 大鼠心肌细胞培养液的制备

取2~3周龄SD大鼠15只，不分雌雄，断颈处死，无菌采取心脏，PBS液洗除血迹后，将心室部分剪成1~2 mm^3的组织块，将组织块摆放在培养皿中，于37 ℃培养箱中培养。组织块贴附2 h后，加入含15%FCS的DMEM培养液继续培养。当心肌细胞长满培养皿时，将心肌细胞培养液离心，弃去细胞碎片，用0.22 μm滤膜过滤，并分装冷冻保存备用。

1.2 小鼠饲养层的制备

无菌条件下取30只雌性昆明小鼠输卵管系统，解剖显微镜下分离出输卵管部分，用小剪刀将输卵管剪成小段，用分离针撕开输卵管小片段，PBS液洗除输卵管内的分泌物。把输卵管小片段摆放入培养皿中，在37 ℃培养箱中培养；2 h后，加入D/F12无血清培养液继续培养。当细胞铺满培养皿后，消化传代，用作体细胞核移植重构胚的饲养层。

取10只怀孕13.5 d的昆明小鼠，去除胎儿头、四肢、内脏及尾部，剪碎胚体，室温消化。加入含血清培养液终止消化，吹打，过滤，离心，接种，37 ℃培养箱中培养。培养液为含15% FCS的DMEM。当小鼠胎儿成纤维细胞铺满培养皿时，换成含10 μg/mL丝裂霉素C的培养液，在培养箱中作用3 h。弃去含丝裂霉素C的培养液，PBS液洗涤。消化细胞层，重新接种到事先用明胶包被的培养皿中，在37 ℃培养箱中培养，用作重构胚中分离ES细胞的饲养层。

1.3 小鼠卵母细胞的获取及培养

取66只成年雌性昆明小鼠，腹腔注射PMSG和hCG进行超排。13~14 h颈部脱臼处死小鼠，取出输卵管系统，M2操作液中撕开输卵管膨大部，使卵母细胞团进入M2操作液中，透明质酸酶消化，M2操作液洗涤，放入改良的M16（mM16）培养液中，在37 ℃培养箱中保存，作为核移植受体细胞待用。

1.4 小鼠供体细胞的准备

从上述卵母细胞团中，收集透明质酸酶消化掉的卵丘细胞，离心，洗涤，置低血清的培养液中于37 ℃培养箱培养待用。使用前离心，并用含10% PVP的PBS液重悬细胞。

取成年雌性小鼠2只的唇部皮肤，采用组织块培养法分离培养成纤维细胞。培养液为含15%FCS的D/F12。对3~4代的细胞采用0.5% FBS的D/F12培养液血清饥饿培养1周，核移植前用含10% PVP的PBS液重悬细胞，用作对照组体细胞核移植的供体细胞。

1.5 小鼠卵母细胞的核移植

在体细胞核移植中，通常采用血清饥饿法使供体细胞处于G_0/G_1（Baguisi et al，1999)。而大多数的卵丘细胞在排卵的时候已处于G_0/G_1期，不需要进行供受体细胞间细胞周期同步化（Kato et al，1999; Schuetz et al，1996)。

将卵母细胞移入含3%蔗糖、5 μg/mL细胞松弛素B的M2操作液中作用10 min后，在显微操作仪上用外径80~100 μm、内径20~25 μm的固定针轻轻固定卵母细胞，再用外径为8~10 μm去核针轻轻拨动旋转卵母细胞，使卵母细胞核在镜下清晰可见。然后再次固定卵母细胞，用去核针直接刺入卵母细胞中，在镜下吸出卵母细胞核及其周围少量的胞质，用作核移植的受体细胞。

在显微操作仪下用外径为6~8 μm的注核针抽

吸卵丘细胞或皮肤成纤维细胞核后，用固定针轻轻固定已去核的卵母细胞，将供体核注射到无核小鼠卵母细胞质中央。注核完毕后，把核移植重构胚移入 mM16 培养液中。2 h 后将重构成功的卵母细胞移至含 10 mmol/L $SrCl_2$ 的 mM16 培养液中，激活（以形成雌雄原核为标志）处理 6 h，统计激活率。然后放入预先制备好的小鼠输卵管上皮细胞单层上，在 37 ℃培养箱中培养。每 48 h 半量换液 1 次，培养液为 mM16。

1.6　ES 细胞的分离培养

将发育到早期囊胚阶段的核移植重构胚，移入事先制备好的小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上，添加 ES 细胞培养液。其组成为 60% 的大鼠心肌细胞培养液、30% 的新鲜 ES 细胞培养液（培养基为 DMEM）和 10% 的 FCS。在 37 ℃培养箱中培养，每 48 h 半量换液 1 次。对孵出的内细胞团逐步消化，逐步接种于小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上，添加 ES 细胞培养液，在 37 ℃培养箱中继续培养，每 48 h 半量换液 1 次。对分离的 ES 细胞集落消化传代接种，并进行常规冻存复苏培养。

1.7　ES 细胞样集落的鉴定

将常规 AKP 染液（α－磷酸萘酚钠、坚固蓝 B 盐）直接滴加于生长有 ES 细胞集落的盖玻片上，37 ℃作用 15 min，流水轻轻冲洗；用苏木素液复染 10 min，再流水轻轻冲洗，晾干，常规制片。取生长旺盛的 ES 细胞集落进行碱性磷酸酶鉴定。

取 ES 细胞集落，PBS 液洗涤后，消化 ES 细胞集落为多个细胞团块。将 ES 细胞团状移植入培养皿内，加入 ES 细胞基础培养液，在 37 ℃培养箱中培养，作为小鼠 ES 细胞体外分化能力观察。

2　结　果

2.1　小鼠卵母细胞的去核效果

小鼠卵母细胞颜色较淡，其细胞核在显微镜下呈“8”或“0”形。在显微操作仪下把清晰可见的卵母细胞核直接吸除后，随机抽取已去核的小鼠卵母细胞，用 H33258 荧光染料染色后，卵母细胞无荧光（图 1，2），染色验证去核成功，表明该种方法去核准确、完全。

2.2　小鼠体细胞核移植重构胚的发育状况

由表 1 知，小鼠卵丘细胞核移植重构胚 2－细胞发育率为60.00%，桑椹胚发育率为21.84%，

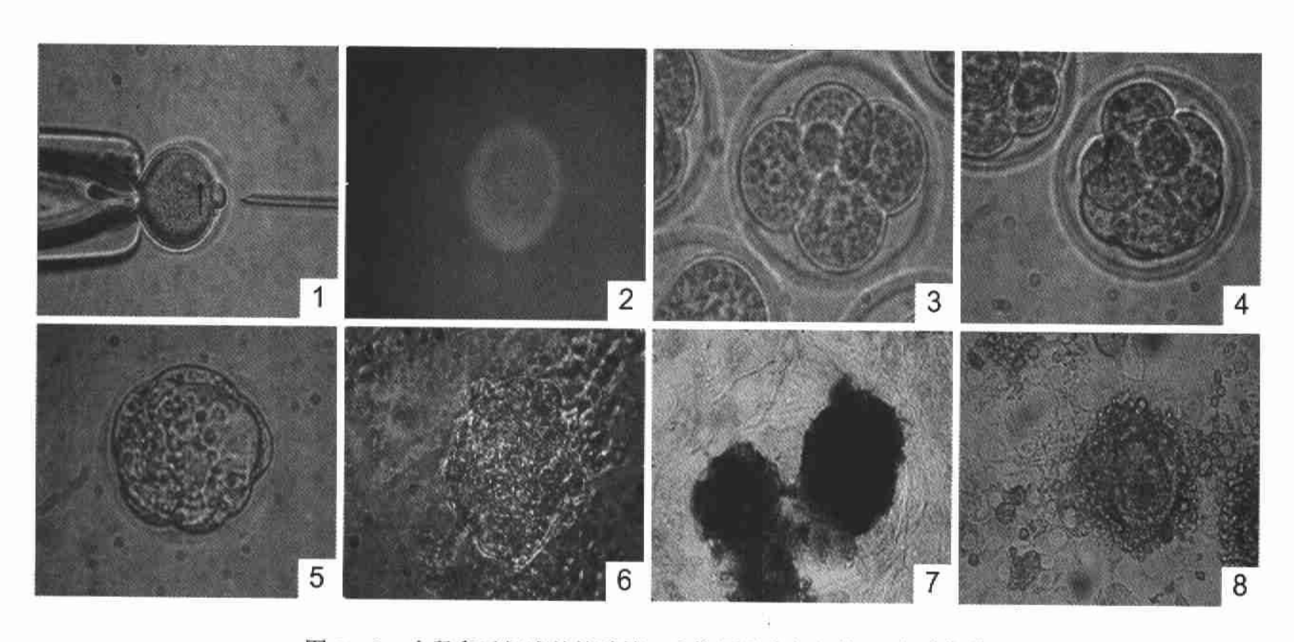


图 1—8　小鼠卵丘细胞的核移植、重构胚及分离出的 ES 细胞集落

Figs. 1－8　Nuclear transfer with cumulus cells and reconstructed embryo and ES cell colonies in mouse

1. 去核时的小鼠卵母细胞，箭头示其细胞核呈“8”形（Enucleation of mouse oocyte，arrow showed mouse oocyte nuclei）×400
2. 去核后小鼠卵母细胞的 H33258 染色（Enucleated mouse oocyte staining with H33258）×400；
3. 4－细胞核移植重构胚（4-cell embryo）×400；
4. 8－细胞核移植重构胚（8-cell embryo）×400；
5. 重构囊胚（Reconstructed blastocyst）×400；
6. 核移植重构胚中分离的 ES 细胞集落（ES cell colony from blastocyst reconstructed）×400；
7. 核移植 ES 细胞样集落的 AKP 染色（ES cell colonies AKP staining）×400；
8. ES 细胞集落体外分化（ES cell colonies differentiated in vitro）×400。

囊胚发育率为11.66%（图3—5）。高于经血清饥饿处理小鼠成纤维细胞核移植重构胚的发育率，两者在支持重构胚的发育能力上无显著差异（$P > 0.05$，t检验）。

2.3 小鼠体细胞核移植重构胚中ES细胞集落的分离培养效果

早期小鼠卵丘细胞重构胚中有9个重构囊胚分离出ES细胞集落，分离率为2.77%。其中5个重构囊胚中分离的ES细胞集落可以稳定地传至第5代（表2）。经过常规冻存和复苏培养后，小鼠ES细胞集落显示出较强的生长和增殖能力，具有同冻存前相似的集落形态。即呈鸟巢状突起，多层密集堆积，边缘清楚，表面平滑，结构致密，细胞团内界线不清楚（图6）。生长旺盛的ES细胞集落周围可见到上皮样或梭形细胞。相同情况下，小鼠成纤维细胞核移植重构胚中有6个重构囊胚分离出ES细胞集落，其中3个可稳定传代。

2.4 小鼠体细胞核移植重构胚中ES细胞集落体外鉴定结果

小鼠体细胞核移植重构胚中分离的ES细胞集落经碱性磷酸酶染色为强阳性，整个集落深染（图7）。分化的ES细胞碱性磷酸酶染色为阴性，说明从重构囊胚中分离的ES细胞保持未分化状态。小鼠ES细胞集落体外分化显示，ES细胞集落体外可以形成类胚体样结构。贴附培养皿底部的类胚体周围出现大量上皮样或梭形细胞，有的单个分布，有的相互连成片铺在培养皿底部，有的相互聚集形成细胞团块（图8），从而说明分离的ES细胞具有发育的全能性和多能性。

表1 小鼠卵丘细胞和成纤维细胞体细胞核移植重构胚的发育率

Tab. 1 Development rate of reconstructed embryo with cumulus cells and fibroblasts in mice (Mean ± SD, %)

供体细胞 Donor cell	2－细胞 2-cell	桑椹胚 Morula	囊胚 Blastocyst
卵丘细胞 Cumulus cell（$n = 325$）	60.00 ± 2.27	21.84 ± 2.32	11.66 ± 1.49
成纤维细胞 Fibroblast（$n = 420$）	54.22 ± 3.10	17.27 ± 2.10	6.95 ± 1.18

表2 两种供体细胞在体细胞核移植重构囊胚ES细胞集落分离中的差异

Tab. 2 Difference in the isolation of mice ES cells from reconstructed blastocysts with cumulus cells and fibroblasts

供体细胞 Donor cell	囊胚数 Blastocyst	ES细胞胚数 Blastocysts with ES cell	5th ES细胞胚数 Blastocysts with 5th ES cell
卵丘细胞 Cumulus cell	38	9	5
成纤维细胞 Fibroblast	29	6	3

3 讨 论

小鼠卵母细胞具有体积小、卵胞质膜脆弱等特点，用外径超过15 μm的去核针在一次性去核过程中较难获得成功，因此去核、注核用针的内外径要适度。去核操作过程中去核失败的原因多为卵胞质膜破裂，因而去核针的针尖要锋利，以免在去核时多次机械性地刺入导致卵母细胞死亡。

在牛的卵母细胞去核中发现，随着培养时间的延长，牛卵母细胞的去核率随之下降（Chan et al, 1995）。老龄化的卵母细胞容易激活，但不易去核（Collas & Robl, 1990）。激活的小鼠卵母细胞同样也会增加去核的操作难度，同时也降低重构胚的发育。因此在体外操作过程中，应尽量避免因操作环境的剧烈变化所导致的小鼠卵母细胞的激活。

小鼠输卵管上皮细胞分泌的一些细胞因子可使小鼠胚胎克服2－细胞阻滞（Kane et al, 1992）。而体细胞核移植重构胚比孤雌激活胚更容易发生2－细胞阻滞现象。本实验利用小鼠的输卵管上皮细胞作饲养层结合mM16培养液，较成功地克服了小鼠重构胚体外发育阻滞，且重构胚体外发育良好。说明输卵管上皮细胞在小鼠体细胞核移植重构胚克服体外发育阻滞等方面发挥着重要作用。

本文改进的培养体系在小鼠卵丘细胞的325枚体细胞核移植重构胚中有38枚发育到囊胚，5枚重构囊胚中分离出可以稳定传代的ES细胞。明显高于Muncie et al（2000）结果（在小鼠卵丘细胞核移植的362枚重构胚中有10枚发育到囊胚，有1枚囊胚分离出稳定的ES细胞），也明显高于

Hochedlinger & Jaenisch (2002) 的实验结果（在小鼠 1000 枚淋巴细胞核移植重构胚中 41 枚发育到囊胚，2 枚分离出稳定 ES 细胞）。说明该培养体系可以较好地用于小鼠的体细胞核移植及重构胚中 ES 细胞分离培养研究。

参考文献：

Ancey C, Corbi P, Froger J, Delwail A, Wijdenes J, Gascan H, Potreau D, Lecron JC. 2002. Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture [J]. *Cytokine*, **18** (4): 199 - 205.

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT. 1999. Production of goats by somatic nuclear transfer [J]. *Nat. Biotechnol.*, **17** (5): 456 - 461.

Chan HW, Li RF, Bou SG. 1995. Study on enhancement of development rate of nuclear transferred bovine embryos [J]. *Chinese Journal of Zoology*, **30** (6): 39 - 43. [詹洪武，李荣凤，旭日干．提高牛体外受精核移植胚胎发育率的研究．动物学杂志，**30** (6): 39 - 43.]

Collas P, Robl JM. 1990. Factors affecting efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo [J]. *Biol. Reprod*, **43** (5): 877 - 884.

Hochedlinger K, Jaenisch R. 2002. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells [J]. *Nature*, **415** (6875): 1035 - 1038.

Kane MT, Carney EW, Eillington JE. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro* [J]. *Theriogenology*, **38** (2): 297 - 313.

Kato Y, Yabuuchi A, Motosugi N, Kato J, Tsunoda Y. 1999. Developmental potential of mouse follicular epithelial cells and cumulus cells after nuclear transfer [J]. *Biol. Reprod.*, **61** (4): 1110 - 1114.

Munsie MJ, Michalska AE, O'Brien CM, Trounson AO, Pera MF, Mountford PS. 2000. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogramed adult mouse somatic cell nuclei [J]. *Curr. Biol*, **10** (16): 989 - 992.

Schuetz AW, Whittingham DG, Snowden R. 1996. Alterations in the cell cycle of mouse cumulus granulosa cells during expansion and mucification in vivo and *in vitro* [J]. *Reprod. Fertil. Dev.*, **8** (6): 935 - 943.